

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
 PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
 Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
 27. Mai 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
 WO 2004/044240 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/012694
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
 13. November 2003 (13.11.2003)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
 102 53 337.7 14. November 2002 (14.11.2002) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, 91056 Erlangen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BARTEN, Roland [DE/DE]; Fröbelstrasse 19, 91058 Erlangen (DE). KUHLMIEIER, Dirk [DE/DE]; Kirchenweg 4, 90419 Nürnberg (DE). WEILAND, Anja [DE/DE]; Sendelbacher Strasse 7, 91099 Poxdorf (DE). KOSAK, Hans [DE/DE]; Von-Witzleben-Strasse 23, 53123 Bonn (DE). HASSMANN, Jörg [DE/DE]; Hofmannstrasse 118a, 91052 Erlangen (DE).
- (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Dr. Gassner & Partner, Nägelsbachstrasse 49 A, 91052 Erlangen (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Veröffentlicht:  
 — ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR CONDUCTING THE PARALLEL IDENTIFICATION OF DIFFERENT NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM PARALLELEN NACHWEIS UNTERSCHIEDLICHER NUKLEINSÄUREN

(57) Abstract: The invention relates to a method for conducting the parallel identification of different nucleic acids S. When nucleic acids S are present, primers are lengthened each of which having an intermediate segment z. The intermediate segment z is amplified by using a second primer pair and is specifically identified by hybridizing with a probe So.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum parallelen Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S. Beim Vorhandensein der Nukleinsäuren S werden Primer verlängert, welche jeweils einen Zwischenabschnitt z aufweisen. Der Zwischenabschnitt z wird jeweils mittels eines zweiten Primerpaars spezifisch amplifiziert und durch Hybridisierung mit je einer Sonde So spezifisch nachgewiesen.

WO 2004/044240 A2

## **Verfahren zum parallelen Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren**

5 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum parallelen Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren und einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Kit.

Ein solches Verfahren ist aus der EP 0 332 435 B2 bekannt.

10 Dabei wird ein im Wesentlichen zu einem diagnostischen Teil einer nachzuweisenden Nukleotidsequenz komplementärer diagnostischer Primer in einer Primerverlängerungsreaktion nur verlängert, wenn das terminale Nukleotid des diagnostischen Primers komplementär zu dem korrespondierenden Nukleotid in dem  
15 diagnostischen Teil ist. Das Produkt der Verlängerung dient in einer mit einem Primerpaar durchgeführten Amplifikationsreaktion als Matrize. Das Vorhandensein oder Fehlen der nachzuweisenden Nukleotidsequenz wird durch das Vorhandensein oder das Fehlen eines Amplifikationsprodukts nachgewiesen.

20

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte kann mittels Gelelektrophorese erfolgen. Dazu ist es erforderlich, dass die Amplifikationsprodukte spezifisch durch ihre Länge oder eine spezifische Markierung identifizierbar sind. Deshalb erlaubt

25

das Verfahren bei mehreren parallel durchzuführenden Nachweisreaktionen nur den Nachweis einer sehr begrenzten Zahl unterschiedlicher Amplifikationsprodukte. Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass es, insbesondere bei einer großen Anzahl von Nachweisen, verhältnismäßig aufwändig ist. Als weiteres Nachweisverfahren wird die Präzipitation, beispielsweise radioaktiv, markierter Amplifikationsprodukte angegeben. Dabei können nur so viele Amplifikationsprodukte parallel nachgewiesen werden, wie auf Grund ihrer spezifischen Markierung voneinander unterschieden werden können.

35

**BESTÄTIGUNGSKOPIE**

Aus der WO 00/58516 ist ein Verfahren zum parallelen Nachweis von Nukleinsäuren bekannt. Dabei wird eine Lösung, die potenziell nachzuweisende Nukleinsäuren enthält, mit einer Mehrzahl von Primern in Kontakt gebracht. Die Primer besitzen jeweils einen 3'-orientierten für eine nachzuweisende Nukleinsäure spezifischen ersten Abschnitt und einen durch Hybridisierung eindeutig identifizierbaren 5'-orientierten zweiten Abschnitt. Die Primer werden mit den nachzuweisenden Nukleinsäuren unter Bedingungen in Kontakt gebracht, unter denen eine spezifische Hybridisierung stattfinden kann. Hybridisierte Primer werden in einer Verlängerungsreaktion je um ein spezifisch markiertes Nukleotid verlängert. Dadurch kann zwischen nachzuweisenden Nukleinsäuren, die sich im dazu komplementären Nukleotid unterscheiden, differenziert werden. Die Primerverlängerungsprodukte werden mit einer Matrix in Kontakt gebracht, auf deren Oberfläche an definierten Positionen zu den zweiten Abschnitten komplementäre Oligonukleotide immobilisiert sind. Nach Hybridisierung werden die verlängerten Primer spezifisch durch ihre Lokalisation auf der Matrix und ihre spezifische Markierung nachgewiesen. Das Verfahren kann zum Nachweis von Nukleinsäuren verwendet werden, welche sich nur in einem Nukleotid unterscheiden. Nachteilig ist, dass das Verfahren nicht sehr empfindlich ist. Weiterhin ist es von Nachteil, dass spezifisch markierte Nukleotide erforderlich sind.

Aus Brownie, J. et al., Nucleic Acids Research, Band 25, Nr. 16 (1997), Seiten 3235 bis 3241 ist ein Verfahren zum Verhindern der Bildung von Primer-Dimeren in einer PCR bekannt. Dabei werden Primer mit einem aus einer zusätzlichen Nukleotidsequenz bestehenden Anhang an ihren 5'-Enden verwendet. Diese Primer sind in einer so niedrigen Konzentration in der PCR vorhanden, dass sie nur an frühen Zyklen der PCR teilnehmen. In weiteren PCR-Zyklen dient ein einzelner die Sequenz des Anhangs aufweisender Primer der Amplifikation. Die Se-

quenz des Anhangs führt bei aus Primer-Dimeren gebildeten Amplifikationsprodukten dazu, dass komplementäre, von der Sequenz des Anhangs abgeleitete Sequenzen eines einzelnen Amplifikationsprodukts miteinander hybridisieren und dabei eine Art "Pfannenstiel"-Struktur bilden. Durch die Hybridisierung wird das Annealing von weiteren Primern an den Anhang verhindert und dadurch die Produktion ungewünschter PCR-Produkte vermieden. Die PCR-Produkte werden gelelektrophoretisch nachgewiesen. Das ist aufwändig und lässt bei parallel in einer PCR durchgeführten Reaktionen nur den Nachweis einer sehr begrenzten Zahl von PCR-Produkten zu.

Aus der US 5,849,544 ist ein Verfahren zum Nachweis einer Nukleinsäure bekannt. Dabei ist eine Fängersonde an einer Gefäßwand immobilisiert. Die nachzuweisende Nukleinsäure wird, beispielsweise durch eine PCR, amplifiziert. Dabei wird auch eine nachzuweisende Markierung, beispielsweise ein Biotin-Gruppe, in das Amplifikationsprodukt eingebaut. Die Fängersonde weist eine Nukleinsäuresequenz auf, welche mit zumindest einem Teil der amplifizierten Zielnukleotidsequenz hybridisieren kann. Die amplifizierte Zielnukleotidsequenz wird mit der Fängersonde unter Bedingungen in Kontakt gebracht, die ein Binden der Fängersonde an die amplifizierte Zielnukleotidsequenz erlauben. Die gebundene amplifizierte Zielnukleotidsequenz kann mittels der Markierungssubstanz nachgewiesen werden.

Aus Jenison, R. et al., Biosensors & Bioelectronics 16 (2001), Seiten 757 bis 763 ist ein Chip bekannt, der auf einer Oberfläche Fängersonden enthält, die spezifisch für bestimmte Virensequenzen sind. Der Chip ermöglicht den Nachweis von spezifischen Produkten einer Multiplex-PCR. Bei der Multiplex-PCR wird eine Mischung verschiedener Primer eingesetzt, die jeweils für eine zu amplifizierende Sequenz spezifisch sind. Der Nachweis von an den Fängersonden gebundenen

PCR-Produkten erfolgt optisch durch eine durch die Bindung und eine Enzym-katalysierte Reaktion bewirkte Änderung der Farbe eines von der Oberfläche reflektierenden Lichts. Nachteilig ist bei diesem Verfahren, dass durch die Verwendung spezifischer Primer für jede der nachzuweisenden Sequenzen die Vervielfältigung dieser Sequenzen mit unterschiedlicher Effizienz erfolgen kann.

Aus der US 5,871,918 ist ein Verfahren zur elektrochemischen Detektion von Nukleinsäuren mit Hilfe einer immobilisierten Fängersonde bekannt. Nach einer Hybridisierung der nachzuweisenden Nukleinsäure mit der Fängersonde wird die hybridisierte DNA mit einem Übergangsmetallkomplex in Kontakt gebracht, der in der Lage ist, eine vorbestimmte Base in der Fängersonde zu oxidieren. Die Redoxreaktion wird elektrochemisch detektiert und mit einer Redoxreaktion der einzelsträngigen Sonde verglichen. Weichen die dabei bestimmten Reaktionsraten voneinander ab, zeigt das eine Hybridisierung an.

Nachteilig bei den aus der US 5,849,544, aus der US 5,871,918 und aus Jenison et al. bekannten Verfahren ist, dass zum parallelen Nachweis verschiedener Nukleinsäuren unter einheitlichen Bedingungen jeweils eine Sequenz für eine Fängersonde ermittelt werden muss, die ein spezifisches Binden einer der nachzuweisenden Nukleinsäuren oder eines PCR-Produkts dieser Nukleinsäuren unter diesen Bedingungen erlaubt. Je größer die Anzahl der nebeneinander nachzuweisenden Nukleinsäuren ist, desto größer ist der Aufwand zum Ermitteln der Sequenzen für die Fängersonden.

In der DE 199 34 084 A1 wird ein Verfahren zum Markieren und Charakterisieren von DNA-Fragmenten offenbart. Dabei wird eine PCR durchgeführt. Bei der PCR werden drei Primer eingesetzt, von denen zwei sequenzspezifische Oligonukleotidprimer sind. Einer dieser Oligonukleotidprimer ist mit einer Adap-

tersequenz versehen, die homolog zu der Oligonukleotidsequenz des dritten Primers ist. Der dritte Primer weist eine Markierungssubstanz auf und dient dazu, Amplifikationsprodukte mit einer Markierung zu erzeugen. Der Nachteil dieses Verfahrens besteht darin, dass es bei einer gleichzeitigen Durchführung mit mehreren zu charakterisierenden DNA-Fragmenten unter einheitlichen Bedingungen wegen unterschiedlicher Bindungskinetiken der Primer zu unterschiedlich effizienten Amplifikationen der verschiedenen DNA-Fragmente kommen kann.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren und einen Kit zum Nachweis einer Nukleinsäure bereitzustellen, welches/r die Nachteile nach dem Stand der Technik vermeidet. Insbesondere soll das Verfahren mit einfachen Mitteln durchzuführen sein und eine hohe Sensitivität aufweisen. Das Verfahren soll insbesondere den parallelen Nachweis einer großen Zahl verschiedener Nukleotidsequenzen unter einheitlichen Bedingungen und insbesondere in einem gemeinsamen Reaktionsansatz ermöglichen.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1 und 31 gelöst. Zweckmäßige Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 2 bis 30 und 32 bis 38.

Erfindungsgemäß ist ein Verfahren zum parallelen Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S mit folgenden Schritten vorgesehen:

a) Bereitstellen je eines zusammen mit einer der Nukleinsäuren S zur Durchführung einer PCR geeigneten ersten Primerpaars mit einem ersten (P1) und einem zweiten Primer (P2),

wobei der erste Primer (P1) einen 5'-endständigen ersten Teilabschnitt (t1) sowie einen 3'-endständigen zweiten Teilabschnitt (t2) und der zweite Primer (P2) einen 5'-endständigen

gen dritten Teilabschnitt (t3) und einen 3'-endständigen vierten Teilabschnitt (t4) aufweist,

5 wobei die Sequenzen des zweiten (t2) und des vierten Teilabschnitts (t4) so ausgewählt sind, dass der zweite Teilabschnitt (t2) mit einem vorgegebenen ersten Abschnitt der einen Nukleinsäure S unter definierten ersten Bedingungen und der vierte Teilabschnitt (t4) mit einem vorgegebenen zweiten Abschnitt einer zu der einen Nukleinsäure S komplementären  
10 Nukleinsäure S' unter definierten zweiten Bedingungen spezifisch hybridisieren und enzymatisch verlängert werden kann und

15 wobei jeweils ein den ersten (t1) mit dem zweiten Teilabschnitt (t2) verbindender für den zweiten Teilabschnitt (t2) spezifischer Zwischenabschnitt z oder ein den dritten (t3) mit dem vierten Teilabschnitt (t4) verbindender für den vierten Teilabschnitt (t4) spezifischer Zwischenabschnitt z vorgesehen ist,

20 wobei die ersten (P1) oder zweiten Primer (P2) der ersten Primerpaare sich jeweils im Zwischenabschnitt z und im sich daran anschließend angeordneten zweiten (t2) oder vierten Teilabschnitt (t4) unterscheiden, wobei jeder der zweiten  
25 (t2) oder vierten Teilabschnitte (t4) spezifisch für genau eine der Nukleinsäuren S ist,

b) Inkontaktbringen der unterschiedlichen Nukleinsäuren S oder der dazu komplementären Nukleinsäuren S' mit den ersten  
30 Primerpaaren in einer Lösung und Durchführen einer ersten Primerverlängerungsreaktion, bei welcher die ersten Primer (P1) unter den ersten Bedingungen oder die zweiten Primer (P2) unter den zweiten Bedingungen zumindest einmal mindestens so weit verlängert werden, dass die jeweils andere Primer (P2, P1) der ersten Primerpaare unter den für deren spe-  
35

zifisches Hybridisieren erforderlichen ersten oder zweiten Bedingungen an jeweils ein dabei gebildetes erstes Primerverlängerungsprodukt spezifisch binden können,

- 5 c) Durchführen einer zweiten Primerverlängerungsreaktion, bei welcher die ersten Primerverlängerungsprodukte jeweils als Matrize dienen und die jeweiligen zweiten (P2) oder ersten Primer (P1) unter den für deren spezifisches Hybridisieren mit den jeweiligen ersten Primerverlängerungsprodukten  
10 erforderlichen ersten oder zweiten Bedingungen unter Bildung je eines zweiten Primerverlängerungsprodukts verlängert werden,
- 15 d) Bereitstellen je eines zusammen mit den jeweiligen zweiten Primerverlängerungsprodukten zur Durchführung einer PCR geeigneten zweiten Primerpaars mit je einem dritten (P3) und einem vierten Primer (P4),
- 20 wobei die Sequenzen des dritten (P3) und vierten Primers (P4) jeweils so gewählt sind, dass der dritte Primer (P3) jeweils mit einer zum ersten Teilabschnitt (t1) komplementären Sequenz und der vierte Primer (P4) jeweils mit einer zum dritten Teilabschnitt (t3) komplementären Sequenz unter definierten dritten Bedingungen spezifisch hybridisieren und enzymatisch  
25 verlängert werden kann,
- 30 e) Inkontaktbringen der zweiten Primerverlängerungsprodukte mit den jeweiligen zweiten Primerpaaren und Durchführen einer PCR, wobei unter Bildung dritter Primerverlängerungsprodukte jeweils der Zwischenabschnitt z oder ein dazu komplementärer Zwischenabschnitt z' amplifiziert wird,
- 35 f) Bereitstellen je einer immobilisierten Sonde (So) für jede nachzuweisende Nukleinsäure S, wobei die Sonde (So) jeweils mit einem der Zwischenabschnitte z oder einem der dazu



komplementären Zwischenabschnitte z' unter definierten vierten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann,

5 g) Inkontaktbringen der Sonden (So) mit den dritten Primerverlängerungsprodukten unter den vierten Bedingungen,

h) Nachweis der an den Sonden (So) bindenden oder gebundenen dritten Primerverlängerungsprodukte.

10 Die ersten, zweiten, dritten und vierten Bedingungen umfassen z. B. bestimmte Temperaturen oder Konzentrationen, bspw. eines Primers. Die ersten und die zweiten Bedingungen sind vorzugsweise identisch. Das Durchführen der ersten Primerverlängerungsreaktion gemäß Schritt lit. b und der zweiten Primer-  
15 verlängerungsreaktion gemäß Schritt lit. c kann gleichzeitig erfolgen. Der erste und der dritte Teilabschnitt sind so gewählt, dass sie unter den ersten oder zweiten Bedingungen jeweils im Wesentlichen nicht mit der Nukleinsäure S oder der dazu komplementären Nukleinsäure S' hybridisieren. Weiterhin  
20 sind der erste und der dritte Teilabschnitt vorzugsweise so ausgewählt, dass sie keine das Verfahren störenden Sekundärstrukturen, wie z. B. Haarnadelschleifen, ausbilden und eine ähnliche Schmelztemperatur, eine Länge von 16 bis 28 Nukleotiden, keine Komplementarität zueinander, insbesondere an den  
25 3'-Enden, ein ausgeglichenes GC-Verhältnis und am 3'-Ende keine GC reichen Regionen aufweisen. Auswahlkriterien für die Wahl der Sequenzen sind im Stand der Technik, z. B. aus Michael A. Innis, David H. Gelfand und John J. Sninsky, PCR Applications: Protocols for Functional Genomics, Academic  
30 Press, San Diego, CA, USA (1999), bekannt.

Bei einer Ausgestaltung des Verfahrens weisen der erste und der dritte Teilabschnitt dieselbe Länge auf oder unterscheiden sich um höchstens 20% in ihrer Länge. Dadurch kann er-  
35 reicht werden, dass die spezifischen Annealingtemperaturen

des mit der zum ersten Teilabschnitt komplementären Sequenz hybridisierenden dritten Primers und des mit der zum dritten Teilabschnitt komplementären Sequenz hybridisierenden vierten Primers relativ eng beieinander liegen. Je enger die Annealingtemperaturen beieinander liegen, desto effizienter kann die PCR gemäß Schritt lit. e durchgeführt werden.

Bei der Sonde kann es sich jeweils um eine Nukleinsäure oder ein Analogon einer Nukleinsäure, wie PNA, handeln. Unter einem Analogon einer Nukleinsäure wird hier jede Struktur verstanden, die spezifisch mit dem Zwischenabschnitt z oder dem dazu komplementären Zwischenabschnitt z' hybridisieren kann. Die Sonden können, z. B. an einer Membran, immobilisiert sein. Die Identifizierung der an die Sonden bindenden oder gebundenen dritten Primerverlängerungsprodukte kann dadurch erfolgen, dass jeweils die Position, in welcher jeweils eine Sonde immobilisiert ist, bekannt ist und der Ort der Hybridisierung detektiert wird. Die Sonden können auch Bestandteil eines Chips sein. Unter einem Chip wird dabei eine feste, starre Oberfläche verstanden, auf der eine der Sonden jeweils an einer definierten Position immobilisiert ist. Weitere Sonden können jeweils an anderen definierten Positionen auf der Oberfläche immobilisiert sein. Auch hier kann die Identifizierung des mit der jeweiligen Sonde hybridisierten dritten Primerverlängerungsprodukts durch Ermitteln des Orts der Hybridisierung erfolgen.

Bei dem Verfahren werden beim Vorhandensein der Nukleinsäure S erste oder zweite Primer verlängert, welche den Zwischenabschnitt z aufweisen. Dass der Zwischenabschnitt z für den zweiten oder vierten Teilabschnitt spezifisch ist, bedeutet, dass ein bestimmter Zwischenabschnitt z eindeutig einem bestimmten zweiten oder vierten Teilabschnitt zugeordnet werden kann. Der Zwischenabschnitt z oder der dazu komplementäre Zwischenabschnitt z' wird mittels dritter und vierter Primer

spezifisch amplifiziert. Durch Hybridisierung des Zwischenabschnitts z oder des dazu komplementären Zwischenabschnitts z' mit einer der Sonden beim Schritt lit. g werden Verlängerungsprodukte der dritten oder vierten Primer spezifisch an der einen Sonde gebunden und können dort beim oder nach dem Binden nachgewiesen werden.

Dadurch, dass jeder Zwischenabschnitt z genau einem zweiten oder vierten Teilabschnitt zugeordnet werden kann und jeder zweite oder vierte Teilabschnitt spezifisch für genau eine der Nukleinsäuren S ist, ist eine Zuordnung jedes Zwischenabschnitts z bzw. jedes dazu komplementären Zwischenabschnitts z' zu einer der Nukleinsäuren S möglich. Durch den spezifischen Nachweis von den Zwischenabschnitt z oder den Zwischenabschnitt z' enthaltenden Primerverlängerungsprodukten kann bestimmt werden, ob in der Lösung mit den zweiten oder vierten Teilabschnitten spezifisch hybridisierende Nukleinsäuren S vorhanden sind.

Der besondere Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht darin, dass durch den Zwischenabschnitt z eine nahezu unbegrenzt große Zahl an spezifischen Kennzeichnungen für Primer zur Verfügung gestellt werden kann. Dadurch ist ein paralleler spezifischer Nachweis einer großen Zahl von Nukleinsäuren möglich. Durch das durch die PCR im Schritt lit. e erreichte exponentielle Amplifizieren des Zwischenabschnitts z oder des dazu komplementären Zwischenabschnitts z' wird eine hohe Sensitivität erreicht.

Ein paralleler Nachweis einer Mehrzahl von Nukleinsäuren kann bisher mittels einer parallelen Amplifikation dieser Nukleinsäuren in einem PCR-Ansatz, einer so genannten Multiplex-PCR, erfolgen. Dabei kann es wegen der erforderlichen hohen Gesamtkonzentration an Primern zur Bildung von Primer-Dimeren und dadurch zu einer Inhibition der gewünschten PCR-

Reaktionen kommen. Ein paralleler Nachweis einer Mehrzahl von Nukleinsäuren mittels Multiplex-PCR ist daher bisher auf den Nachweis weniger Nukleinsäuren mit wenigen Primerpaaren beschränkt. Beim parallelen Nachweis einer Mehrzahl unterschiedlicher Nukleinsäuren S mittels des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es deshalb besonders vorteilhaft, dass das jeweils erste Primerpaar in so geringer Konzentration bereitgestellt werden kann, dass durch die Konzentration der ersten Primerpaare keine Störungen verursacht werden.

Bei einem parallelen Nachweis einer Mehrzahl von Nukleinsäuren mittels Multiplex-PCR werden die Nukleinsäuren bisher üblicherweise ungleichmäßig stark vervielfältigt. Bei einer ungleichmäßigen Vervielfältigung können sich die Mengen der erzeugten Amplifikationsprodukte so sehr voneinander unterscheiden, dass bei einzelnen Nukleotidsequenzen noch nicht die zum Nachweis erforderliche Mindestmenge erzeugt ist, während andere Nukleotidsequenzen bereits deutlich detektierbar sind. Der Grund für die ungleichmäßige Vervielfältigung kann darin bestehen, dass sich wegen der exponentiellen Vermehrung in der PCR schon kleine Unterschiede in der Effizienz der verschiedenen Primer stark auf die Menge der gebildeten Produkte auswirken. Die Effizienz der Primer wird insbesondere durch die Länge der Primer und die Bindungskinetik, mit der die Primer an die nachzuweisende Nukleinsäure binden, bestimmt. Diese kleinen Unterschiede in der Effizienz sind aber bei einer Multiplex-PCR, bedingt durch die unterschiedlichen Sequenzen der nachzuweisenden Nukleinsäuren, nahezu zwangsläufig vorhanden. Es werden spezifische Primer unterschiedlicher Sequenz und häufig auch unterschiedlicher Länge eingesetzt. Dieser Nachteil kann durch die vorliegende Erfindung dadurch überwunden werden, dass die erste und zweite Primerverlängerungsreaktion nur einmal oder wenige Male durchgeführt werden muss. Weil dabei auf eine exponentielle Amplifikation verzichtet werden kann, wirkt sich bei parallel durch-

geführten Nachweisreaktionen eine unterschiedliche Effizienz zwischen unterschiedlichen ersten Primerpaaren bei der jeweils ersten und zweiten Primerverlängerungsreaktion nur geringfügig auf die Menge der dritten Primerverlängerungsprodukte aus. Das zweite Primerpaar kann unabhängig von der Sequenz der nachzuweisenden Nukleinsäure S gestaltet werden. Dadurch können zweite Primerpaare mit einheitlicher Effizienz bei der PCR bereitgestellt werden. Beispielsweise können dazu alle ersten Primerpaare einen ersten Primer mit einem einheitlichen ersten Teilabschnitt und einen zweiten Primer mit einem einheitlichen dritten Teilabschnitt aufweisen. Damit liegen zwei für alle nachzuweisenden unterschiedlichen Nukleinsäuren S gleiche universelle Primerbindungsstellen vor. Dadurch ist es möglich, beim Schritt lit. d für alle nachzuweisenden Nukleinsäuren S ein gemeinsames zweites Primerpaar bereitzustellen und damit beim Schritt lit. e eine PCR durchzuführen.

Beim parallelen Nachweis mehrerer unterschiedlicher Nukleinsäuren S besteht ein weiterer Vorteil des Verfahrens darin, dass die Primer so gestaltet werden können, dass die Nachweise unter einheitlichen Bedingungen durchgeführt werden können. Weiterhin ist es vorteilhaft, dass einmal ermittelte Bedingungen für das Hybridisieren des Zwischenabschnitts z oder des dazu komplementären Zwischenabschnitts z' mit der Sonde für verschiedene Nachweisreaktionen verwendet werden können. Dazu kann der Zwischenabschnitt z in unterschiedlichen ersten oder zweiten Primern mit unterschiedlichen zweiten oder vierten Teilabschnitten kombiniert sein. Dadurch kann z. B. ein verschiedene immobilisierte Sonden aufweisender Chip bereitgestellt werden. Der Chip kann mit den Sequenzen der Sonden und der Zwischenabschnitte z für das erfinderische Verfahren optimiert und zum Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S genutzt werden.

Vorzugsweise werden die erste und zweite Primerverlängerungsreaktion als PCR durchgeführt. Dadurch können diese Primerverlängerungsreaktionen mit Enzymen und Nukleotiden durchgeführt werden, die für die Durchführung der PCR im Schritt  
5 lit. e erforderlich sind. Das Verfahren wird dadurch vereinfacht, denn es müssen nur einmal Enzyme und Nukleotide zugesetzt werden.

Es hat sich weiterhin als vorteilhaft erwiesen, wenn die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion und/oder PCR  
10 unter so genannten Heißstartbedingungen durchgeführt wird. Dabei wird die Temperatur des Reaktionsansatzes erhöht und sichergestellt, dass eine eingesetzte DNA-Polymerase erst dann die ersten, zweiten, dritten und/oder vierten Primer  
15 verlängert, wenn die Temperatur im Reaktionsansatz mindestens die für ein spezifisches Annealing dieser Primer erforderliche Temperatur erreicht hat. Das kann z. B. dadurch sichergestellt werden, dass für die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion und/oder PCR die DNA-Polymerase dem jeweiligen Reaktionsansatz erst nach Erreichen dieser Temperatur  
20 zugesetzt wird oder indem eine Polymerase verwendet wird, die erst durch Erhitzen aktiviert wird. Dadurch wird vermieden, dass unspezifisch bindende erste, zweite, dritte oder vierte Primer verlängert werden.

Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens wird die erste Primerverlängerungsreaktion unter den ersten Bedingungen und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion unter den  
25 zweiten Bedingungen höchstens 10 mal, vorzugsweise höchstens 5 mal, insbesondere höchstens 2 mal, durchgeführt. Das bedeutet nicht, dass die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion insgesamt nicht öfter als 10, 5 bzw. 2 mal stattfindet, sondern dass sie nur höchstens 10, 5 bzw. 2 mal unter den für eine spezifische und effiziente erste und/oder  
30 zweite Primerverlängerungsreaktion günstigen ersten und/oder  
35

zweiten Bedingungen durchgeführt wird. Selbst wenn die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion auch noch später unter den dritten Bedingungen stattfindet, können die dritten Bedingungen durch eine entsprechende Gestaltung der Sequenzen der ersten (t1) und dritten Teilabschnitte (t3) so gewählt werden, dass sie für die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion ungünstig sind, so dass insgesamt eine niedrige Anzahl erster und/oder zweiter Primerverlängerungsreaktionen stattfindet. Eine niedrige Anzahl erster und/oder zweiter Primerverlängerungsreaktionen bewirkt, dass es sich bei einer Mehrzahl von parallel in einem Reaktionsansatz durchgeführten Nachweisreaktionen kaum auf die Menge der gebildeten dritten Primerverlängerungsprodukte auswirkt, wenn die ersten und/oder zweiten Primerverlängerungsreaktionen mit unterschiedlicher Effizienz ablaufen.

Als besonders vorteilhaft hat es sich erwiesen, wenn die Sequenzen des ersten und dritten Teilabschnitts so gewählt sind, dass die dritten Bedingungen so stringent sein können, dass der zweite Teilabschnitt mit dem ersten Abschnitt der einen Nukleinsäure S und der vierte Teilabschnitt mit dem zweiten Abschnitt der zu der einen Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' unter den dritten Bedingungen im Wesentlichen nicht hybridisiert. Das ermöglicht es, die Reaktion in einem Ansatz durchzuführen, der von vorne herein die ersten, zweiten, dritten und vierten Primer enthält. Durch bloßes Erhöhen der Stringenz, z. B. durch Temperaturerhöhung, lässt sich dann die erste und zweite Primerverlängerungsreaktion beenden und es findet nur noch eine Verlängerung der dritten und vierten Primer bei der PCR statt, obwohl die ersten und zweiten Primer weiterhin im Ansatz enthalten sind.

Bei einer Ausgestaltung des Verfahrens sind die Sequenzen und Konzentrationen des ersten, zweiten, dritten und vierten Primers so gewählt, dass die spezifische Annealingtemperatur des

mit der zum ersten Teilabschnitt komplementären Sequenz hybridisierenden dritten Primers und des mit der zum dritten Teilabschnitt komplementären Sequenz hybridisierenden vierten Primers jeweils zumindest um 5 °C höher ist als die jeweils  
5 höhere Annealingtemperatur des mit dem ersten Abschnitt der einen Nukleinsäure S hybridisierenden zweiten Teilabschnitts und des mit dem zweiten Abschnitt der komplementären Nukleinsäure S' hybridisierenden vierten Teilabschnitts. Dadurch, dass die Annealingtemperaturen zumindest um 5 °C auseinander  
10 liegen, kann durch eine Erhöhung der Stringenz, z. B. durch eine Erhöhung der Temperatur, sicher vermieden werden, dass die erste oder zweite Primerverlängerungsreaktion beim Durchführen der PCR gemäß lit. e stattfindet.

15 Der Schritt lit. e kann in der Lösung durchgeführt werden. Es ist nicht erforderlich die ersten Primerverlängerungsprodukte aus der Lösung zu entfernen und in eine weitere Lösung zu überführen. Vorzugsweise werden zumindest die Schritte lit. a bis lit. e, insbesondere die Schritte lit. a bis lit. h in  
20 einem verschlossenen Gefäß durchgeführt, welches zwischen den Schritten nicht geöffnet wird. Dadurch können das Ergebnis verfälschende Kontaminationen vermieden werden. Weiterhin vereinfacht die Nutzung eines geschlossenen Gefäßes die Handhabung und Automation des Verfahrens.

25 Bei einer vorteilhaften Ausgestaltung des Verfahrens wird die Konzentration des den Zwischenabschnitt z enthaltenden ersten oder zweiten Primers in der Lösung so niedrig gewählt, dass durch diesen Primer ein Hybridisieren der Sonde mit dem jeweiligen Zwischenabschnitt z oder des dazu komplementären  
30 Zwischenabschnitts z' der dritten Primerverlängerungsprodukte beim Schritt lit. g nicht wesentlich inhibiert wird. Nicht wesentlich inhibiert bedeutet, dass das Hybridisieren beim Schritt lit. g in einem für den Nachweis beim Schritt lit. h ausreichenden Ausmaß stattfindet. Durch die genannten Merkma-  
35



le kann weit gehend verhindert werden, dass ein solcher Primer beim Schritt lit. g mit den Verlängerungsprodukten der dritten oder vierten Primer um die Bindung an der Sonde konkurriert. Es kann auch weit gehend verhindert werden, dass  
5 die Hybridisierung der Sonde mit dem zum Zwischenabschnitt z komplementären Zwischenabschnitt z' durch ein Hybridisieren des Zwischenabschnitts z' mit diesem Primer inhibiert wird. Dadurch wird das Verfahren wesentlich vereinfacht. Ein Entfernen eines Überschusses von den Zwischenabschnitt z enthal-  
10 tenden ersten oder zweiten Primern ist nicht erforderlich. Durch die niedrige Konzentration kann im Wesentlichen auch verhindert werden, dass durch eine Hybridisierung einer der genannten Primer mit der Sonde ein eigentlich dem Nachweis dienendes Signal ausgelöst wird. Durch eine niedrige Konzen-  
15 tration des ersten Primerpaars kann außerdem die Bildung von Dimeren aus ersten und zweiten Primern verhindert werden. Sie ermöglicht beim parallelen Nachweis mehrerer Nukleinsäuren S in einem Ansatz den Einsatz einer Vielzahl unterschiedlicher erster Primerpaare, ohne in der Gesamtkonzentration dieser  
20 Primerpaare den für Primerverlängerungsreaktionen günstigen Konzentrationsbereich für Primer zu überschreiten.

Vorzugsweise wird die Konzentration des jeweils ersten Primerpaars in der Lösung auf 0,001 bis 0,1  $\mu\text{mol/l}$  eingestellt.  
25 Vorteilhaft ist es, wenn das Verhältnis der Konzentrationen von jeweils erstem Primerpaar zu jeweils zweitem Primerpaar kleiner als 1:10, vorzugsweise kleiner als 1:100, besonders vorzugsweise kleiner als 1:1000, ist. Je kleiner das Verhältnis ist, desto weniger konkurriert der Zwischenabschnitt z  
30 des ersten oder zweiten Primers mit den Verlängerungsprodukten der dritten oder vierten Primer um die Bindung an der Sonde oder mit der Sonde um die Bindung an dem zum Zwischenabschnitt z komplementären Zwischenabschnitt z'.

Die zweiten Primerpaare können der Lösung vor der ersten Primerverlängerungsreaktion zugesetzt werden. Das Verfahren wird dadurch vereinfacht. Zwischen der ersten und der zweiten Primerverlängerungsreaktion sind dadurch keine Pipettierschritte erforderlich. Das Durchführen der ersten oder zweiten Primer-  
5 verlängerungsreaktion kann ausschließlich über Temperatur gesteuert werden.

Vorzugsweise wird beim Schritt lit. e der dritte oder der  
10 vierte Primer häufiger verlängert als der jeweils andere Primer des zweiten Primerpaars. Das kann z. B. erreicht werden, indem in dem beim Schritt lit. d bereitgestellten zweiten Primerpaar der dritte oder vierte Primer gegenüber dem jeweils anderen darin enthaltenen Primer in einem, vorzugsweise  
15 2- bis 5-fachen, Überschuss vorliegt. Unter diesen asymmetrischen Bedingungen kann gezielt das an die Sonde bindende Verlängerungsprodukt gegenüber dem anderen Verlängerungsprodukt des dritten oder vierten Primers im Überschuss gebildet werden. Dadurch kann eine mit der Hybridisierung mit der Sonde  
20 konkurrierende Hybridisierung der Verlängerungsprodukte der dritten und vierten Primer untereinander deutlich vermindert werden, so dass ein größerer Anteil der dritten Primerverlängerungsprodukte an die Sonde bindet. Das kann die Sensitivität des Nachweises verbessern bzw. ein stärkeres Signal beim  
25 Nachweis ermöglichen. Weiterhin ist das Verfahren dadurch effizienter und wirtschaftlicher, weil jeweils nur eines der beiden gebildeten dritten Primerverlängerungsprodukte zum Nachweis benötigt wird. Ein weiteren Vorteil besteht darin, dass die gebildeten PCR-Produkte nicht vor Durchführung des  
30 Schritts lit. g denaturiert werden müssen, um ein Hybridisieren mit den Sonden zu ermöglichen, weil nur ein Teil der an die Sonde bindenden Zwischenabschnitte z oder dazu komplementären Zwischenabschnitte z' hybridisiert mit ihrem in der PCR gemäß lit. e gebildeten Gegenstrang vorliegt. Wenn auf das  
35 Denaturieren verzichtet wird, werden auch häufig zufällig

vorliegende in sich rückgefaltete Sequenzen nicht denaturiert. Dadurch können diese Sequenzen nicht mit den Zwischenabschnitten z oder den dazu komplementären Zwischenabschnitten z' um eine spezifische Hybridisierung an den Sonden kompetitieren. Dadurch wird die Sensitivität und Spezifität des Nachweises erhöht. Wenn das üblicherweise durch Erhitzen erfolgende Denaturieren nicht erfolgt, werden auch, beispielsweise zu einem elektrochemischen Detektieren verwendete, Elektroden weniger stark beansprucht und weisen dadurch eine größere Haltbarkeit auf.

Der Lösung kann eine Mehrzahl erster Primerpaare zugesetzt werden, deren erste Primer einen jeweils identischen oder nahezu identischen ersten Teilabschnitt und/oder deren zweite Primer einen jeweils identischen oder nahezu identischen dritten Teilabschnitt aufweisen und deren zweiter oder vierter Teilabschnitt jeweils spezifisch für genau eine der Nukleinsäuren S ist. Teilabschnitte sind nahezu identisch, wenn die gleichen Primer damit hybridisieren können. Dadurch ist es möglich, jeweils alle dritten und jeweils alle vierten Primer einheitlich zu gestalten, so dass nur ein zweites Primerpaar erforderlich ist. Dadurch wird das Verfahren erheblich vereinfacht.

Die Sequenzen der ersten, zweiten, dritten und vierten Primer können so gewählt sein, dass sie bei dem Verfahren keine Primer-Dimere bilden und/oder nicht mit sich selbst oder untereinander hybridisieren. Die Ausbildung von Primer-Dimeren führt bei der PCR zu einer verminderten Produktion des gewünschten Produkts, z. B. der dritten Primerverlängerungsprodukte. Möglichkeiten die Bildung von Primer-Dimeren zu unterdrücken sind aus Brownie, J. et al., Nucleic Acids Research, Band 25, Nr. 16 (1997), Seiten 3235 bis 3241 bekannt. Weiterhin sollen weder erste mit zweiten oder dritte mit vierten Primern noch erste mit ersten, zweite mit zweiten, dritte mit

dritten oder vierte mit vierten Primern oder sonstige Primer unter den Bedingungen des Verfahrens miteinander hybridisieren können. Das erhöht die Effizienz des Verfahrens. Weiterhin ist es zur Effizienzsteigerung vorteilhaft, wenn die Sequenzen der Zwischenabschnitte z so gewählt sind, dass sie weder selbst noch die dazu komplementären Zwischenabschnitte z' bei dem Verfahren mit sich selbst oder mit den ersten, zweiten, dritten oder vierten Teilabschnitten oder deren komplementären Sequenzen hybridisieren.

Vorzugsweise sind die Sequenzen der Zwischenabschnitte z so gewählt, dass Hybride der Zwischenabschnitte z mit dazu jeweils vollkommen komplementären Nukleinsäuresträngen eine im Wesentlichen identische, insbesondere in einem Temperaturbereich von 5° C liegende, Schmelztemperatur aufweisen würden. Dadurch wird der Schritt lit. g vereinfacht, weil die vierten Bedingungen für sämtliche dritten Primerverlängerungsprodukte im Wesentlichen identisch sind. Dadurch können beim Schritt lit. g alle dritten Primerverlängerungsprodukte gleichzeitig an die für sie jeweils spezifischen Sonden binden.

Das Verfahren ist auch geeignet, die eine Nukleinsäure S in Gegenwart einer sich von der einen Nukleinsäure S nur in einer in der einen Nukleinsäure S enthaltenen ersten Base unterscheidenden weiteren Nukleinsäure spezifisch nachzuweisen. Die Nukleinsäure S und die weitere Nukleinsäure können beispielsweise polymorphe Nukleinsäuren sein. Dabei ist es vorteilhaft, wenn die Sequenzen der ersten oder zweiten Primer so gewählt sind, dass sich die jeweilige Base des zweiten oder vierten Teilabschnitts, die zu der ersten Base oder einer dazu komplementären zweiten Base einer komplementären Nukleinsäure S' komplementär ist, am 3'-Ende oder in der Nähe des 3'-Endes des jeweils ersten oder zweiten Primers befindet. In der Nähe bedeutet dabei insbesondere, dass sich zwischen der jeweiligen Base und dem Ende höchstens 3 Nukleotide

befinden. Die ersten oder zweiten Bedingungen der ersten oder zweiten Primerverlängerungsreaktion können dabei so gewählt werden, dass ein Primer, der eine Base aufweist, die nicht komplementär ist, bei der ersten oder zweiten Primerverlängerungsreaktion nicht verlängert wird.

Die Spezifität des Verfahrens kann weiter erhöht werden, indem die zweiten oder vierten Teilabschnitte eine Base enthalten, welche nicht zu einer ihr in der Position entsprechenden dritte Base im ersten Abschnitt der einen Nukleinsäure S oder im zweiten Abschnitt der zu der einen Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' komplementär ist. Eine Base im zweiten oder vierten Teilabschnitt entspricht in der Position der dritten Base, wenn die dritte Base ihr beim Hybridisieren des zweiten oder vierten Teilabschnitts mit dem ersten oder zweiten Abschnitt gegenüberliegend positioniert wäre. Durch die nicht komplementäre Base in den zweiten oder vierten Teilabschnitten wird erreicht, dass beim Nachweis polymorpher Nukleinsäuren im Falle einer Hybridisierung mit einer nicht spezifischen weiteren Nukleinsäure zwei Fehlpaarungen vorliegen, während bei der Hybridisierung mit der spezifischen Nukleinsäure S nur eine Fehlpaarung vorliegt. Unter einer Fehlpaarung wird eine Paarung nicht komplementärer Basen verstanden. Häufig wird ein hybridisierter Primer, der nur einfach fehlgepaart ist, dennoch verlängert, während ein zweifach fehlgepaarter Primer nicht verlängert wird, insbesondere weil ein zwei Fehlpaarungen aufweisendes Hybrid relativ instabil ist.

Die jeweiligen Sequenzen der ersten, zweiten, dritten und vierten Primer und der Sonde können so gewählt sein, dass jeweils die ersten, jeweils die zweiten, jeweils die dritten und/oder jeweils die vierten Bedingungen für den Nachweis der unterschiedlichen Nukleinsäuren S identisch sind. Wenn jeweils alle ersten, jeweils alle zweiten, jeweils alle dritten

und jeweils alle vierten Bedingungen identisch sind wird ein paralleler Nachweis der unterschiedlichen Nukleinsäuren S in einem Reaktionsansatz ermöglicht. Die Sequenzen sollten so gewählt werden, dass unter den genannten Bedingungen spezifische Hybridisierungen ohne Kreuzhybridisierungen erfolgen.

Besonders effizient kann das Verfahren gestaltet werden, wenn die Sonden jeweils an einer Elektrode oder in deren unmittelbarer Nähe immobilisiert sind. Der Nachweis gemäß Schritt lit. h kann dann durch Erfassen einer durch das Hybridisieren bedingten Änderung einer elektrischen Eigenschaft an der Elektrode erfolgen. In unmittelbarer Nähe bedeutet dabei, dass die jeweilige Sonde so nah an der Elektrode immobilisiert ist, dass Hybridisierungen mit der Sonde an der Elektrode noch elektrisch erfasst und der Sonde zugeordnet werden können.

Die Elektroden können auch unabhängig von einem auf einer Änderung einer elektrischen Eigenschaft beruhenden Nachweis dazu dienen, die dritten Primerverlängerungsprodukte durch elektrostatische Anziehung an der Sonde anzureichern. In unmittelbarer Nähe bedeutet dann, dass die Sonde so im Verhältnis zu der Elektrode angeordnet ist, dass ein solches Anreichern möglich ist. Weiterhin kann die Elektrode auch dazu dienen, durch elektrostatische Abstoßung unspezifisch gebundene dritte Primerverlängerungsprodukte von der Sonde zu entfernen. Der Nachweis beim Schritt lit. h kann auch durch Erfassen einer durch das Hybridisieren bedingten Änderung einer fluoreszenzoptischen Eigenschaft erfolgen.

Bei der Änderung der elektrischen Eigenschaft kann es sich um eine Änderung einer Redox-Eigenschaft, insbesondere bei der Oxidation von Guanin- oder Adenin-Resten der dritten Primerverlängerungsprodukte, einer Impedanz oder einer Leitfähigkeit handeln, welche über die jeweilige Elektrode gemessen

wird. Die Redox-Eigenschaft kann ein Redox-Potenzial sein, dessen Änderung durch elektrochemische Umsetzung des an der Sonde gebundenen dritten Primerverlängerungsprodukts, z. B. durch Differenzielle Puls-Voltammetrie oder Chronopotentiometrische Stripping-Analyse, erfasst wird. Beispielsweise kann die Bindung des dritten Primerverlängerungsprodukts an der Sonde durch Oxidation von dessen Guanin- und/oder Adenin-Resten elektrochemisch nachgewiesen werden. Als Elektrode kann eine Kohlenstoff enthaltende Elektrode oder eine Metallelektrode, insbesondere eine Goldelektrode, verwendet werden.

Der dritte und/oder vierte Primer kann einen an der Elektrode fluoreszenzoptisch oder mittels der Elektrode elektrisch oder elektrochemisch nachweisbaren, vorzugsweise redoxaktiven, Marker aufweisen. Der Marker kann direkt oder indirekt nachweisbar sein. Indirekt ist z. B. ein Marker nachweisbar, welcher ein spezifisches Affinitätsmolekül ist bzw. aufweist. Ein spezifisches Affinitätsmolekül ist ein Molekül, an das mit hoher Spezifität und Affinität ein Gegenmolekül bindet. Das Affinitätsmolekül kann z. B. Biotin oder ein Hapten und das entsprechende Gegenmolekül Streptavidin oder ein Antikörper sein. Das Gegenmolekül kann z. B. mit einem Fluoreszenzfarbstoff, einem redoxaktiven Molekül oder einem Enzym konjugiert sein. Bei dem Enzym kann es sich um ein Enzym handeln, welches ein Substrat so umsetzen kann, dass das Reaktionsprodukt elektrochemisch oder optisch spezifisch nachgewiesen werden kann. Das Enzym kann z. B. eine Phosphatase sein, welche durch die enzymatische Umsetzung von Naphthylphosphat elektrochemisch nachgewiesen werden kann. Ist der Marker direkt nachzuweisen, kann er einen Osmium-Komplex, ein Nanogold-Partikel, eine Cystein-, Ferrocenyl-, Daunomycin-, Benzochinon-, Naphthochinon-, Anthrachinon- oder p-Aminophenol-Gruppe, einen Farbstoff, insbesondere Indophenol, Thiazin oder Phenazin, oder einen Fluoreszenzfarbstoff, insbesondere

6-FAM, HEX, TET, Cy3, Cy5, IRDye™700, IRDye™800, Biodipy, Flourescein, Joe, Rox, TAMRA oder Texas Red, aufweisen. Mit den genannten Fluoreszenzfarbstoffen markierte Oligonukleotide können von der Firma Thermo Hybaid, Sedanstrasse 18, D-89077 Ulm, Deutschland bezogen werden.

Vorzugsweise wird eine Vielzahl unterschiedlicher zu den Zwischenabschnitten z oder den dazu komplementären Zwischenabschnitten z' komplementärer Sonden verwendet, von denen jede an oder in unmittelbarer Nähe einer separaten Elektrode gebunden ist, so dass von einem Signal an einer spezifischen Elektrode auf das Vorhandensein einer spezifischen Nukleinsäure S geschlossen werden kann. Eine Vielzahl einzeln kontaktierter oder kontaktierbarer auf einer Oberfläche, insbesondere einem Elektrodenchip, angeordneter Elektroden kann verwendet werden. Unter einem Elektrodenchip wird hier eine nicht notwendigerweise aus Halbleitermaterial bestehende kleine Platte mit elektronischen Mikrostrukturen verstanden. Je kleiner die Oberfläche ist, desto geringer ist das für den Nachweis erforderliche Volumen der Lösung.

Eine RNA kann indirekt dadurch nachgewiesen werden, dass sie in eine DNA umgeschrieben und die DNA dann als Nukleinsäure S nachgewiesen wird. Das Umschreiben kann mittels des Enzyms "Reverse Transkriptase" erfolgen.

Weiterhin betrifft die Erfindung einen Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum parallelen Nachweis einer Mehrzahl unterschiedlicher Nukleinsäuren S enthaltend:

a) für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je ein zusammen mit der Nukleinsäure S zur Durchführung einer PCR geeignetes erstes Primerpaar mit einem ersten und einem zweiten Primer,



wobei der erste Primer einen 5'-endständigen ersten Teilabschnitt sowie einen 3'-endständigen zweiten Teilabschnitt und der zweite Primer einen 5'-endständigen dritten Teilabschnitt und einen 3'-endständigen vierten Teilabschnitt aufweist,

5

wobei die Sequenzen des zweiten und des vierten Teilabschnitts so ausgewählt sind, dass der zweite Teilabschnitt mit einem vorgegebenen ersten Abschnitt der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S unter definierten ersten Bedingungen und der vierte Teilabschnitt mit einem vorgegebenen zweiten Abschnitt einer zu der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' unter definierten zweiten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann und

10

15 wobei ein den ersten mit dem zweiten Teilabschnitt verbindender für den zweiten Teilabschnitt spezifischer Zwischenabschnitt z oder ein den dritten mit dem vierten Teilabschnitt verbindender für den vierten Teilabschnitt spezifischer Zwischenabschnitt z vorgesehen ist und

20

b) für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je ein zweites Primerpaar mit einem dritten und einem vierten Primer, welches zusammen mit einem bei Anwesenheit der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S mittels des ersten und zweiten Primers erzeugbaren Primerverlängerungsprodukt zur Durchführung einer PCR geeignet ist und

25

wobei die Sequenzen des dritten und vierten Primers so gewählt sind, dass der dritte Primer mit einer zum ersten Teilabschnitt des ersten Primers komplementären Sequenz und der vierte Primer mit einer zum dritten Teilabschnitt des zweiten Primers komplementären Sequenz unter definierten dritten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann.

30

In dem Kit kann für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je eine Sonde enthalten sein, welche jeweils mit dem Zwischenabschnitt z oder dem dazu komplementären Zwischenabschnitt z' unter definierten vierten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann. Die Sonden können, insbesondere in einer spezifischen Anordnung, beispielsweise auf einem Chip, immobilisiert sein.

Vorzugsweise sind die ersten Teilabschnitte der in dem Kit enthaltenen ersten Primer und/oder die dritten Teilabschnitte der in dem Kit enthaltenen zweiten Primer gleich. Das ermöglicht es, für alle nachzuweisenden Nukleinsäuren S einheitliche dritte und/oder vierte Primer zu verwenden.

Die Sequenzen der Zwischenabschnitte z sind vorzugsweise so gewählt, dass die vierten Bedingungen für alle Zwischenabschnitte z oder die dazu komplementären Zwischenabschnitte z' identisch sind. Das ermöglicht es, dass alle Zwischenabschnitte z oder dazu komplementäre Zwischenabschnitte z' der dritten Primerverlängerungsprodukte gleichzeitig an die jeweilige Sonde binden können. Die Auswahl der Sequenzen ermöglicht eine vereinfachte und beschleunigte Durchführung des Verfahrens.

Der Kit kann weiterhin eine Anordnung von Elektroden enthalten, wobei an oder in unmittelbarer Nähe jeder Elektrode der Anordnung jeweils eine Sonde immobilisiert ist. Dabei sind die Sonden so immobilisiert, dass eine eindeutige Zuordnung jeder Elektrode zu einer Sonde möglich ist. Die Anordnung von Elektroden kann aus Elektroden bestehen, welche auf einer Oberfläche angeordnet sind. Die Anordnung von Elektroden kann ein Elektrodenchip sein.

Statt des ersten Primerpaars können in dem Kit Angaben der Sequenzen des ersten Teilabschnitts, des dritten Teilab-

schnitts und des Zwischenabschnitts z oder der dazu jeweils komplementären Sequenzen enthalten sein. Mittels dieser Angaben kann der Anwender des Kits das erste Primerpaar für beliebige nachzuweisende Nukleinsäuren S selbst herstellen oder  
5 herstellen lassen.

Nachfolgend werden Ausführungsbeispiele der Erfindung anhand der Zeichnung näher erläutert. Hierbei zeigen:

Fig. 1 eine schematische Darstellung eines ersten (P1) und  
10 eines zweiten Primers (P2),

Fig. 2 eine schematische Darstellung einer ersten und zweiten Primerverlängerungsreaktion,

15 Fig. 3 eine schematische Darstellung einer PCR und

Fig. 4 eine schematische Darstellung eines mit einer immobilisierten Sonde hybridisierten Primerverlängerungsprodukts.  
20

Der in Fig. 1 dargestellte erste Primer P1 besteht aus einem 5'-endständigen ersten Teilabschnitt t1 und einem 3'-endständigen zweiten Teilabschnitt t2. Der zweite Primer P2 besteht aus einem 5'-endständigen dritten Teilabschnitt t3 und einem  
25 3'-endständigen vierten Teilabschnitt t4. Zwischen dem dritten t3 und dem vierten Teilabschnitt t4 befindet sich der Zwischenabschnitt z. Der zweite Teilabschnitt t2 ist zu einem vorgegebenen ersten Abschnitt in einer nachzuweisenden Nukleinsäure S komplementär. Der vierte Teilabschnitt t4 ist zu  
30 einem vorgegebenen zweiten Abschnitt der zur nachzuweisenden Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' komplementär. Der erste t1 und der dritte Teilabschnitt t3 sind bevorzugt weder zu einem Abschnitt der Nukleinsäure S noch zu der dazu komplementären Nukleinsäure S' komplementär.  
35

In den oberen beiden Abbildungen der Fig. 2 sind erste Primerverlängerungsreaktionen dargestellt. Zunächst wird dazu die mit der Nukleinsäure S' doppelsträngig vorliegende Nukleinsäure S, z. B. durch eine Temperaturerhöhung, denaturiert, d.h. einzelsträngig gemacht. Dann hybridisiert der zweite Teilabschnitt t2 mit dem ersten Abschnitt der nachzuweisenden Nukleinsäure S und der vierte Teilabschnitt t4 mit dem zweiten Abschnitt der zur Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S'. Bei der ersten Primerverlängerungsreaktion werden der erste P1 und der zweite Primer P2 jeweils zumindest so weit verlängert, dass der jeweils andere Primer P2 oder P1 an einem dabei gebildeten ersten Primerverlängerungsprodukt binden kann. Bei einer anschließend durchgeführten in den unteren beiden Abbildungen der Fig. 2 dargestellten zweiten Primerverlängerungsreaktion dient das jeweils erste Primerverlängerungsprodukt als Matrize. Es werden zweite Primerverlängerungsprodukte gebildet, welche jeweils eine zum ersten P1 und zweiten Primer P2 komplementäre Sequenz aufweisen. Das Verfahren kann auch mit einer nachzuweisenden Nukleinsäure S durchgeführt werden, welche anfänglich ohne die dazu komplementäre Nukleinsäure S' vorliegt. Der zweite Primer P2 könnte dann erst mit dem ersten Primerverlängerungsprodukt anstatt mit der komplementären Nukleinsäure S' hybridisieren.

Die obere Abbildung der Fig. 3 zeigt aus der Verlängerung der ersten P1 und der zweiten Primer P2 entstandene zweite Primerverlängerungsprodukte. Mit deren 5'-Enden hybridisiert jeweils ein dritter P3 und ein mit einer Markierungssubstanz bzw. einem Marker versehener vierter Primer P4. Durch eine PCR entsteht eine große Anzahl dritter Primerverlängerungsprodukte der dritten P3 und vierten Primer P4. Das ist in der unteren Abbildung der Fig. 3 schematisch dargestellt. Bei der PCR wird der Zwischenabschnitt z bzw. ein dazu komplementärer Zwischenabschnitt z' vervielfältigt.

In Fig. 4 ist das Hybridisieren eines zum Zwischenabschnitt z komplementären Zwischenabschnitts z' mit einer dazu komplementären Sequenz einer an einer Elektrode E immobilisierten Sonde So dargestellt. Durch das Hybridisieren wird der Marker M so in die Nähe der Elektrode E gebracht, dass er dort durch eine Änderung einer elektrischen Eigenschaft nachgewiesen werden kann. Bei dem Marker M kann es sich um eine redoxaktive Substanz, wie beispielsweise Osmiumtetroxyd, handeln, welche an der Elektrode reduziert bzw. oxidiert werden kann. Das über die Elektrode E messbare Redoxsignal des Markers M zeigt somit das ursprüngliche Vorhandensein der Nukleinsäure S an.

## Patentansprüche

1. Verfahren zum parallelen Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S mit folgenden Schritten:

5

a) Bereitstellen je eines zusammen mit einer der Nukleinsäuren S zur Durchführung einer PCR geeigneten ersten Primerpaars mit einem ersten (P1) und einem zweiten Primer (P2),

10

wobei der erste Primer (P1) einen 5'-endständigen ersten Teilabschnitt (t1) sowie einen 3'-endständigen zweiten Teilabschnitt (t2) und der zweite Primer (P2) einen 5'-endständigen dritten Teilabschnitt (t3) und einen 3'-endständigen vierten Teilabschnitt (t4) aufweist,

15

wobei die Sequenzen des zweiten (t2) und des vierten Teilabschnitts (t4) so ausgewählt sind, dass der zweite Teilabschnitt (t2) mit einem vorgegebenen ersten Abschnitt der einen Nukleinsäure S unter definierten ersten Bedingungen und der vierte Teilabschnitt (t4) mit einem vorgegebenen zweiten Abschnitt einer zu der einen Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' unter definierten zweiten Bedingungen spezifisch hybridisieren und enzymatisch verlängert werden kann und

25

wobei jeweils ein den ersten (t1) mit dem zweiten Teilabschnitt (t2) verbindender für den zweiten Teilabschnitt (t2) spezifischer Zwischenabschnitt z oder ein den dritten (t3) mit dem vierten Teilabschnitt (t4) verbindender für den vierten Teilabschnitt (t4) spezifischer Zwischenabschnitt z vorgesehen ist,

30

wobei die ersten (P1) oder zweiten Primer (P2) der ersten Primerpaare sich jeweils im Zwischenabschnitt z und im sich daran anschließend angeordneten zweiten (t2) oder vierten

35

Teilabschnitt (t4) unterscheiden, wobei jeder der zweiten (t2) oder vierten Teilabschnitte (t4) spezifisch für genau eine der Nukleinsäuren S ist,

5 b) Inkontaktbringen der unterschiedlichen Nukleinsäuren S oder der dazu komplementären Nukleinsäuren S' mit den ersten Primerpaaren in einer Lösung und Durchführen einer ersten Primerverlängerungsreaktion, bei welcher die ersten Primer (P1) unter den ersten Bedingungen oder die zweiten Primer (P2) unter den zweiten Bedingungen zumindest einmal mindestens so weit verlängert werden, dass die jeweils anderen Primer (P2, P1) der ersten Primerpaare unter den für deren spezifisches Hybridisieren erforderlichen ersten oder zweiten Bedingungen an jeweils ein dabei gebildetes erstes Primerverlängerungsprodukt spezifisch binden können,

10

15

c) Durchführen einer zweiten Primerverlängerungsreaktion, bei welcher die ersten Primerverlängerungsprodukte jeweils als Matrize dienen und die jeweiligen zweiten (P2) oder ersten Primer (P1) unter den für deren spezifisches Hybridisieren mit den jeweiligen ersten Primerverlängerungsprodukten erforderlichen ersten oder zweiten Bedingungen unter Bildung je eines zweiten Primerverlängerungsprodukts verlängert werden,

20

25

d) Bereitstellen je eines zusammen mit den jeweiligen zweiten Primerverlängerungsprodukten zur Durchführung einer PCR geeigneten zweiten Primerpaars mit je einem dritten (P3) und einem vierten Primer (P4),

30

wobei die Sequenzen des dritten (P3) und vierten Primers (P4) jeweils so gewählt sind, dass der dritte Primer (P3) jeweils mit einer zum ersten Teilabschnitt (t1) komplementären Sequenz und der vierte Primer (P4) jeweils mit einer zum dritten Teilabschnitt (t3) komplementären Sequenz unter definier-

35

ten dritten Bedingungen spezifisch hybridisieren und enzymatisch verlängert werden kann,

- 5 e) Inkontaktbringen der zweiten Primerverlängerungsprodukte mit den jeweiligen zweiten Primerpaaren und Durchführen einer PCR, wobei unter Bildung dritter Primerverlängerungsprodukte jeweils der Zwischenabschnitt z oder ein dazu komplementärer Zwischenabschnitt z' amplifiziert wird,
- 10 f) Bereitstellen je einer immobilisierten Sonde (So) für jede nachzuweisende Nukleinsäure S, wobei die Sonde (So) jeweils mit einem der Zwischenabschnitte z oder einem der dazu komplementären Zwischenabschnitte z' unter definierten vier-
- 15 ten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann,
- g) Inkontaktbringen der Sonden (So) mit den dritten Primerverlängerungsprodukten unter den vierten Bedingungen,
- 20 h) Nachweis der an den Sonden (So) bindenden oder gebundenen dritten Primerverlängerungsprodukte.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die erste und zweite Primerverlängerungsreaktion als PCR durchgeführt werden.
- 25 3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion und/oder PCR unter Heißstartbedingungen durchgeführt wird.
- 30 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die erste Primerverlängerungsreaktion unter den ersten Bedingungen und/oder zweite Primerverlängerungsreaktion unter den zweiten Bedingungen höchstens 10 mal, vorzugsweise höchstens 5 mal, insbesondere höchstens 2 mal, durchgeführt wird.
- 35 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei



die Sequenzen des ersten (t1) und dritten Teilabschnitts (t3) so gewählt sind, dass die dritten Bedingungen so stringent sein können, dass der zweite Teilabschnitt (t2) mit dem ersten Abschnitt der einen Nukleinsäure S und der vierte Teilabschnitt (t4) mit dem zweiten Abschnitt der zu der einen Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' unter den dritten Bedingungen im Wesentlichen nicht hybridisiert.

6. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Sequenzen und Konzentrationen des ersten (P1), zweiten (P2), dritten (P3) und vierten Primers (P4) so gewählt sind, dass die spezifische Annealingtemperatur des mit der zum ersten Teilabschnitt (t1) komplementären Sequenz hybridisierenden dritten Primers (P3) und des mit der zum dritten Teilabschnitt (t3) komplementären Sequenz hybridisierenden vierten Primers (P4) jeweils zumindest um 5 °C höher ist als die jeweils höhere Annealingtemperatur des mit dem ersten Abschnitt der einen Nukleinsäure S hybridisierenden zweiten Teilabschnitts (t2) und des mit dem zweiten Abschnitt der komplementären Nukleinsäure S' hybridisierenden vierten Teilabschnitts (t4).

7. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei Schritt lit. e in der Lösung durchgeführt wird.

8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zumindest die Schritte lit. a bis lit. e, insbesondere die Schritte lit. a bis lit. h in einem verschlossenen Gefäß durchgeführt werden, welches zwischen den Schritten nicht geöffnet wird.

9. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Konzentration des den Zwischenabschnitt z enthaltenden ersten oder zweiten Primers (P1, P2) in der Lösung so niedrig gewählt wird, dass durch diesen Primer (P1, P2) ein Hybridi-

sieren der Sonde (So) mit dem jeweiligen Zwischenabschnitt z oder dem dazu komplementären Zwischenabschnitt z' der dritten Primerverlängerungsprodukte beim Schritt lit. g nicht wesentlich inhibiert wird.

5

10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Konzentration des jeweils ersten Primerpaars in der Lösung auf 0,001 bis 0,1  $\mu\text{mol/l}$  eingestellt wird.

10

11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Verhältnis der Konzentrationen von jeweils erstem Primerpaar zu jeweils zweitem Primerpaar kleiner als 1:10, vorzugsweise kleiner als 1:100, besonders vorzugsweise kleiner als 1:1000, ist.

15

12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die zweiten Primerpaare der Lösung vor der ersten Primerverlängerungsreaktion zugesetzt werden.

20

13. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei beim Schritt lit. e jeweils der dritte (p3) oder der vierte Primer (P4) häufiger verlängert wird als der jeweils andere Primer (P4, P3) der jeweiligen zweiten Primerpaare.

25

14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in dem beim Schritt lit. d bereitgestellten zweiten Primerpaar der dritte (P3) oder vierte Primer (P4) gegenüber dem jeweils anderen darin enthaltenen Primer (P4, P3) im Überschuss vorliegt.

30

15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Lösung eine Mehrzahl erster Primerpaare zugesetzt wird, deren erste Primer (P1) einen jeweils identischen oder nahezu identischen ersten Teilabschnitt (t1) und/oder deren zweite

35

Primer (P2) einen jeweils identischen oder nahezu identischen

dritten Teilabschnitt (t3) aufweisen und deren zweiter (t2) oder vierter Teilabschnitt (t4) jeweils spezifisch für genau eine der Nukleinsäuren S ist.

- 5 16. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Sequenzen der ersten (P1), zweiten (P2), dritten (P3) und vierten Primer (P4) so gewählt sind, dass sie bei dem Verfahren keine Primer-Dimere bilden und/oder nicht mit sich selbst oder untereinander hybridisieren.
- 10 17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Sequenzen der Zwischenabschnitte z so gewählt sind, dass sie weder selbst noch die dazu komplementären Zwischenabschnitte z' bei dem Verfahren mit sich selbst oder mit den
- 15 ersten (t1), zweiten (t2), dritten (t3) oder vierten Teilabschnitten (t4) oder deren komplementären Sequenzen hybridisieren.
- 20 18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Sequenzen der Zwischenabschnitte z so gewählt sind, dass Hybride der Zwischenabschnitte z mit dazu jeweils vollkommen komplementären Nukleinsäuren eine im wesentlichen identische, insbesondere in einem Temperaturbereich von 5 °C liegende, Schmelztemperatur aufweisen würden.
- 25 19. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei zum spezifischen Nachweis der einen Nukleinsäure S in Gegenwart einer sich von der einen Nukleinsäure S nur in einer in der einen Nukleinsäure S enthaltenen ersten Base unterscheidenden weiteren Nukleinsäure die Sequenzen der ersten (P1) oder zweiten Primer (P2) so gewählt sind, dass sich die jeweilige Base des zweiten (t2) oder vierten Teilabschnitts
- 30 (t4), die zu der ersten Base oder einer dazu komplementären zweiten Base einer komplementären Nukleinsäure S' komplementären

tär ist, am 3'-Ende oder in der Nähe des 3'-Endes des jeweils ersten (P1) oder zweiten Primers (P2) befindet.

20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
5 die zweiten (t2) oder vierten Teilabschnitte (t4) eine Base  
enthalten, welche nicht zu einer ihr in der Position entsprechenden dritten Base im ersten Abschnitt der einen Nukleinsäure S oder im zweiten Abschnitt der Nukleinsäure S' komplementär ist.

10 21. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
die jeweiligen Sequenzen der ersten (P1), zweiten (P2), dritten (P3) und vierten Primer (P4) und der Sonde (So) so gewählt sind, dass jeweils die ersten, jeweils die zweiten, je-  
15 weils die dritten und/oder jeweils die vierten Bedingungen  
für den Nachweis der unterschiedlichen Nukleinsäuren S identisch sind.

22. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
20 die Sonde (So) jeweils an einer Elektrode (E) oder in deren unmittelbarer Nähe immobilisiert sind.

23. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei  
25 der Nachweis beim Schritt lit. h durch Erfassen einer Änderung einer fluoreszenzoptischen Eigenschaft oder einer durch das Hybridisieren bedingten Änderung einer elektrischen Eigenschaft an der Elektrode (E) erfolgt.

24. Verfahren nach Anspruch 23, wobei als Änderung der elektrischen Eigenschaft eine Änderung einer Redox-Eigenschaft,  
30 insbesondere bei der Oxidation von Guanin- oder Adenin-Resten der dritten Primerverlängerungsprodukte, einer Impedanz oder einer Leitfähigkeit über die Elektrode (E) gemessen wird.

25. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der dritte (P3) und/oder der vierte Primer (P4) einen, insbesondere fluoresszenzoptisch oder mittels der Elektrode (E) elektrisch oder elektrochemisch nachweisbaren, vorzugsweise redoxaktiven, Marker aufweist.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei der Marker ein spezifisches Affinitätsmolekül, einen Osmium-Komplex, ein Nanogold-Partikel, eine Cystein-, Ferrocenyl-, Daunomycin-, Benzochinon-, Naphthochinon-, Anthrachinon- oder p-Aminophenol-Gruppe, einen Farbstoff, insbesondere Indophenol, Thiazin oder Phenazin, oder einen Fluoreszenzfarbstoff, insbesondere 6-FAM, HEX, TET, Cy3, Cy5, IRDye™700, IRDye™800, Biodipy, Fluorescein, Joe, Rox, TAMRA oder Texas Red, aufweist.

27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, wobei der Marker ein Affinitätsmolekül ist und dessen Nachweis mittels eines das Affinitätsmolekül spezifisch bindenden Gegenmoleküls erfolgt, wobei das Gegenmolekül mit einem Enzym konjugiert ist, welches ein Substrat so umsetzen kann, dass das Reaktionsprodukt elektrochemisch oder optisch spezifisch nachgewiesen werden kann.

28. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Vielzahl unterschiedlicher zu den Zwischenabschnitten z oder den dazu komplementären Zwischenabschnitten z' komplementärer Sonden (So) verwendet wird, von denen jede an oder in unmittelbarer Nähe einer separaten Elektrode (E) gebunden ist.

29. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine Vielzahl einzeln kontaktierter oder kontaktierbarer auf einer Oberfläche, insbesondere einem Elektrodenchip, angeordneter Elektroden (E) verwendet wird.

30. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine RNA indirekt nachgewiesen wird, indem sie in eine DNA umgeschrieben und die DNA dann als Nukleinsäure S nachgewiesen wird.

5

31. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der vorhergehenden Ansprüche zum parallelen Nachweis einer Mehrzahl unterschiedlicher Nukleinsäuren S enthaltend:

10 a) für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je ein zusammen mit der Nukleinsäure S zur Durchführung einer PCR geeignetes erstes Primerpaar mit einem ersten (P1) und einem zweiten Primer (P2),

15 wobei der erste Primer (P1) einen 5'-endständigen ersten Teilabschnitt (t1) sowie einen 3'-endständigen zweiten Teilabschnitt (t2) und der zweite Primer (P2) einen 5'-endständigen dritten Teilabschnitt (t3) und einen 3'-endständigen vierten Teilabschnitt (t4) aufweist,

20

wobei die Sequenzen des zweiten (t2) und des vierten Teilabschnitts (t4) so ausgewählt sind, dass der zweite Teilabschnitt (t2) mit einem vorgegebenen ersten Abschnitt der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S unter definierten ersten  
25 Bedingungen und der vierte Teilabschnitt (t4) mit einem vorgegebenen zweiten Abschnitt einer zu der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S komplementären Nukleinsäure S' unter definierten zweiten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann und

30

wobei ein den ersten (t1) mit dem zweiten Teilabschnitt (t2) verbindender für den zweiten Teilabschnitt (t2) spezifischer Zwischenabschnitt z oder ein den dritten (t3) mit dem vierten Teilabschnitt (t4) verbindender für den vierten Teilabschnitt  
35 (t4) spezifischer Zwischenabschnitt z vorgesehen ist und

b) für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je ein zweites Primerpaar mit einem dritten (P3) und einem vierten Primer (P4), welches zusammen mit einem bei Anwesenheit der jeweils nachzuweisenden Nukleinsäure S mittels des ersten (P1) und zweiten Primers (P2) erzeugbaren Primerverlängerungsprodukt zur Durchführung einer PCR geeignet ist und

wobei die Sequenzen des dritten (P3) und vierten Primers (P4) so gewählt sind, dass der dritte Primer (P3) mit einer zum ersten Teilabschnitt (t1) des ersten Primers komplementären Sequenz und der vierte Primer (P4) mit einer zum dritten Teilabschnitt (t3) des zweiten Primers komplementären Sequenz unter definierten dritten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann.

15

32. Kit nach Anspruch 31, wobei darin für jede nachzuweisende Nukleinsäure S je eine Sonde (So) enthalten ist, welche jeweils mit dem Zwischenabschnitt z oder dem dazu komplementären Zwischenabschnitt z' unter definierten vierten Bedingungen spezifisch hybridisieren kann.

20

33. Kit nach Anspruch 32, wobei die Sonden (So) immobilisiert sind.

25

34. Kit nach einem der Ansprüche 31 bis 33, wobei die ersten Teilabschnitte (t1) der in dem Kit enthaltenen ersten Primer (P1) gleich sind und/oder die dritten Teilabschnitte (t3) der in dem Kit enthaltenen zweiten Primer (P2) gleich sind.

30

35. Kit nach einem der Anspruch 31 bis 34, wobei die Sequenzen der Zwischenabschnitte z so gewählt sind, dass die vierten Bedingungen für alle Zwischenabschnitte z oder die dazu komplementären Zwischenabschnitte z' identisch sind.

36. Kit nach einem der Ansprüche 31 bis 35, wobei eine Anordnung von Elektroden (E) enthalten ist, wobei an oder in unmittelbarer Nähe jeder Elektrode (E) der Anordnung jeweils eine Sonde (So) immobilisiert ist.

5

37. Kit nach Anspruch 36, wobei die Anordnung von Elektroden (E) ein Elektrodenchip ist.

10 38. Kit nach einem der Ansprüche 31 bis 37, wobei statt des ersten Primerpaars Angaben der Sequenzen des ersten Teilabschnitts (t1), des dritten Teilabschnitts (t3) und des Zwischenabschnitts z oder der dazu jeweils komplementären Sequenzen enthalten sind.



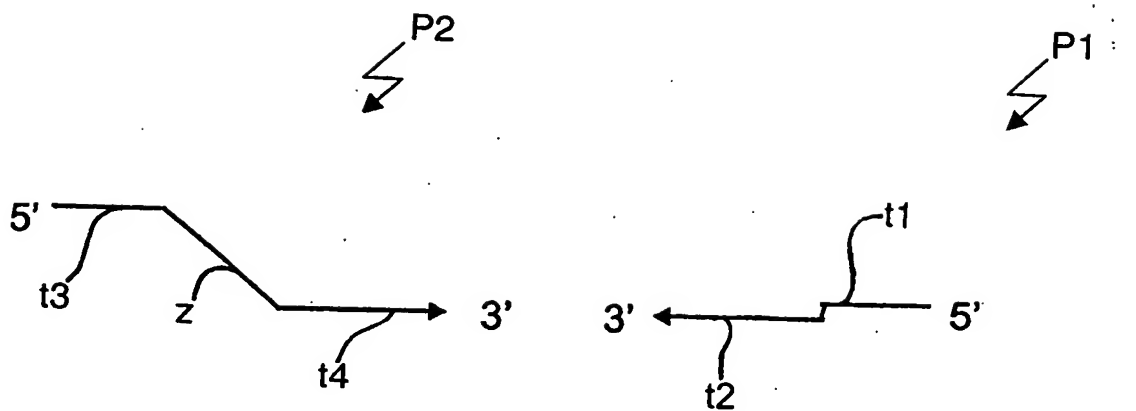


Fig. 1

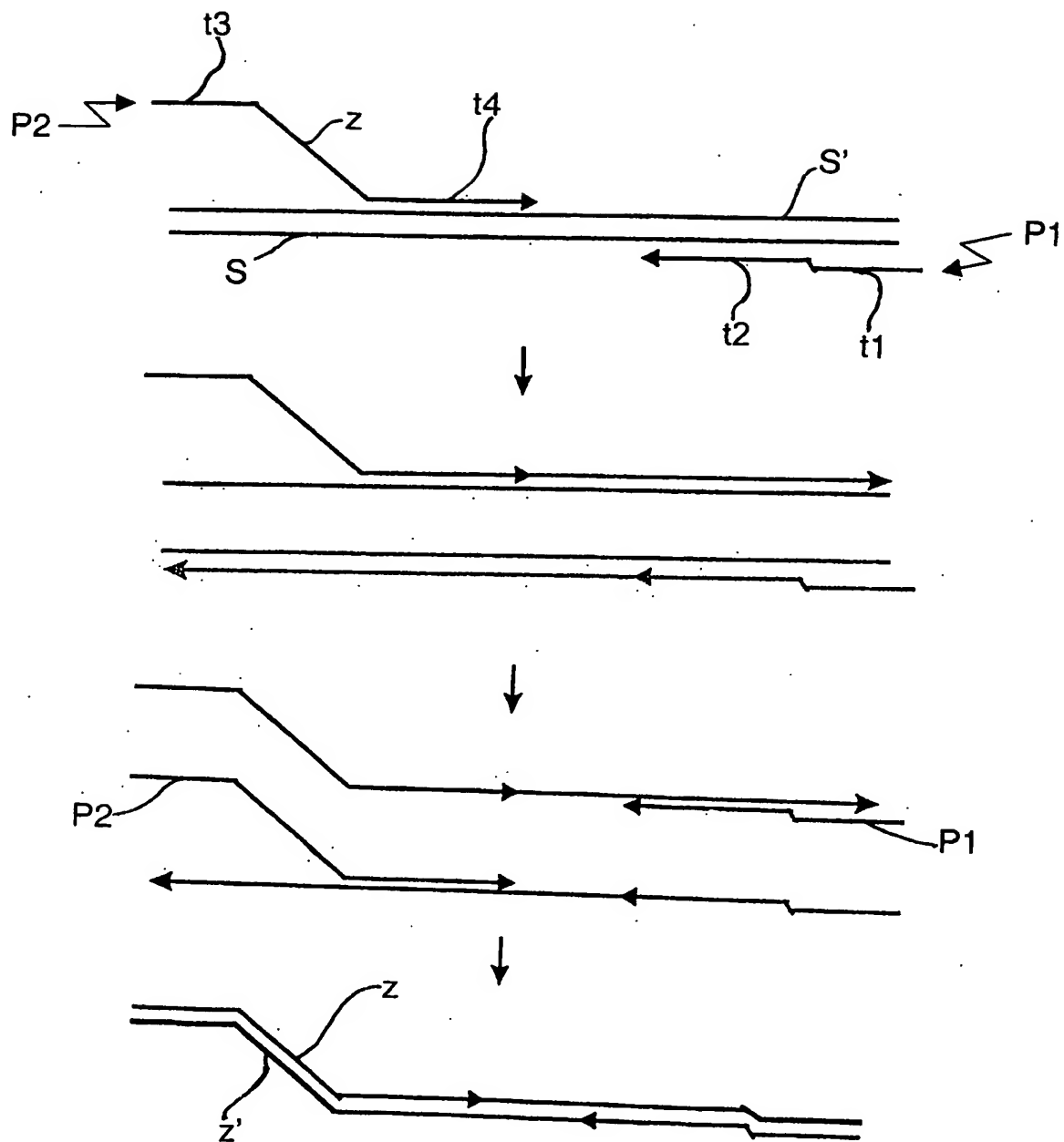


Fig. 2

3/4

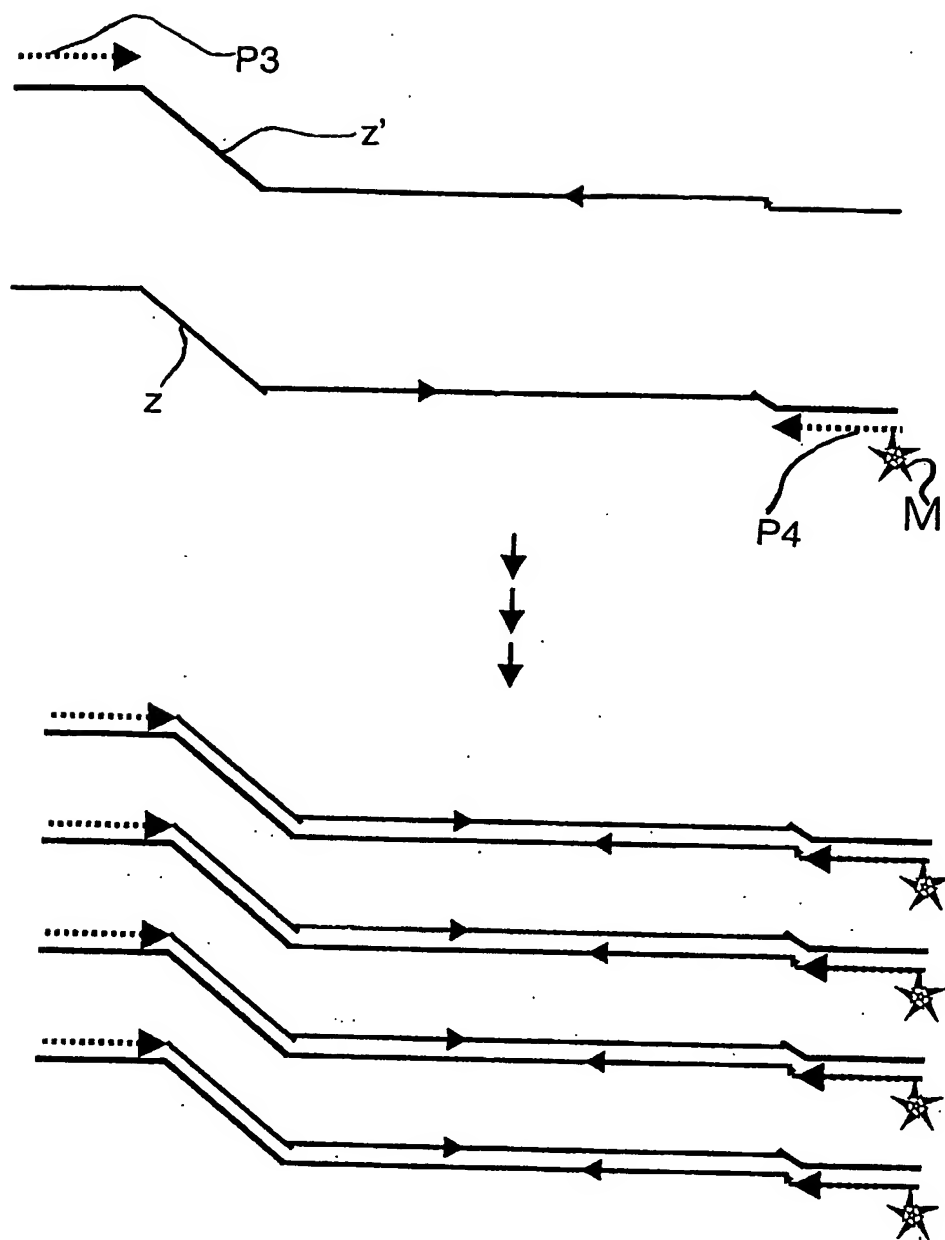


Fig. 3

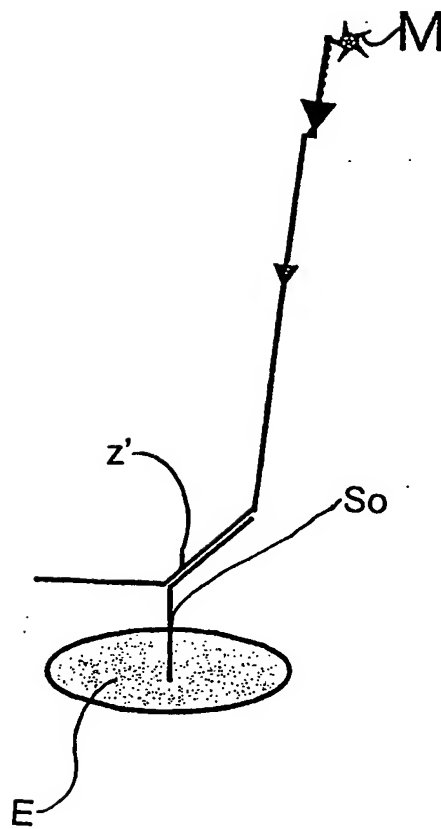


Fig. 4

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
27. Mai 2004 (27.05.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2004/044240 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12Q 1/68 (74) Anwalt: GASSNER, Wolfgang; Dr. Gassner & Partner, Nägelsbachstrasse 49 A, 91052 Erlangen (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/012694 (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:  
13. November 2003 (13.11.2003) (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität:  
102 53 337.7 14. November 2002 (14.11.2002) DE
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): NOVEMBER AKTIENGESELLSCHAFT GESELLSCHAFT FÜR MOLEKULARE MEDIZIN [DE/DE]; Ulrich-Schalk-Strasse 3a, 91056 Erlangen (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): BARTEN, Roland [DE/DE]; Fröbelstrasse 19, 91058 Erlangen (DE). KUHLMETTER, Dirk [DE/DE]; Kirchenweg 4, 90419 Nürnberg (DE). WEILAND, Anja [DE/DE]; Sendelbacher Strasse 7, 91099 Poxdorf (DE). KOSAK, Hans [DE/DE]; Von-Witzleben-Strasse 23, 53123 Bonn (DE). HASSMANN, Jörg [DE/DE]; Hofmannstrasse 118a, 91052 Erlangen (DE).
- Veröffentlicht:  
— mit internationalem Recherchenbericht
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 29. Juli 2004
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR CONDUCTING THE PARALLEL IDENTIFICATION OF DIFFERENT NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM PARALLELEN NACHWEIS UNTERSCHIEDLICHER NUKLEINSÄUREN

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for conducting the parallel identification of different nucleic acids S. When nucleic acids S are present, primers are lengthened each of which having an intermediate segment z. The intermediate segment z is amplified by using a second primer pair and is specifically identified by hybridizing with a probe So.

(57) **Zusammenfassung:** Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum parallelen Nachweis unterschiedlicher Nukleinsäuren S. Beim Vorhandensein der Nukleinsäuren S werden Primer verlängert, welche jeweils einen Zwischenabschnitt z aufweisen. Der Zwischenabschnitt z wird jeweils mittels eines zweiten Primerpaars spezifisch amplifiziert und durch Hybridisierung mit je einer Sonde So spezifisch nachgewiesen.

WO 2004/044240 A3

## INTERNATIONALE RECHTENBERICHT

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 7 C1201/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 7 C120

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, PAJ

### C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99/58721 A (WHITEHEAD BIOMEDICAL INST ;LANDER ERIC S (US); WANG DAVID G (US)) 18. November 1999 (1999-11-18) Seite 3 -Seite 24; Ansprüche 1,3,6-8,13,15,19-22,27-30; Abbildungen 1-3; Beispiele 4,5 ----	1-38
X	DE 100 46 184 A (NOVEMBER AG GES FUER MOLEKULAR) 4. April 2002 (2002-04-04) Spalte 3-8; Ansprüche 1-63; Abbildungen 1-4 ----- -/--	1-18, 22-38 19-21

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

• **Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen** :

**"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist**

\*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

**"L"** Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

\*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

\*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

**T\*** Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

**"X"** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

**\*)** Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

**"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist**

**Datum des Abschlusses der internationalen Recherche**

16. April 2004

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

06/05/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Botz, J

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	SHUBER A P ET AL: "A SIMPLIFIED PROCEDURE FOR DEVELOPING MULTIPLEX PCRS" GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, Bd. 5, Nr. 5, 1. Dezember 1995 (1995-12-01), Seiten 488-493, XP000546034 ISSN: 1088-9051	1-18
Y	das ganze Dokument	19-38
X	WO 96/41012 A (GENZYME CORP ;SHUBER ANTHONY P (US)) 19. Dezember 1996 (1996-12-19)	1-18
Y	Seite 1 -Seite 21	19-38
X	WO 02/14534 A (BIOQUANT LTD ;POTTER COLLIN GERALD (GB)) 21. Februar 2002 (2002-02-21)	1-18
Y	das ganze Dokument	19-38
P,X	WO 03/060159 A (GARDNER REBECCA ;RUDI KNUT (NO); HOLCK ASKILD (NO); MATFORSK (NO)) 24. Juli 2003 (2003-07-24)	1-38
Y	das ganze Dokument	
Y	WO 00/47766 A (GIBSON NEIL JAMES ;FOY CAROLE ANN (GB); ASTRAZENECA UK LTD (GB); H) 17. August 2000 (2000-08-17)	19-21
Y	Seite 2 -Seite 5; Ansprüche 1-7	
Y	PASTINEN T ET AL: "MINISEQUENCING: A SPECIFIC TOOL FOR DNA ANALYSIS AND DIAGNOSTICS ON OLIGONUCLEOTIDE ARRAYS" GENOME RESEARCH, COLD SPRING HARBOR LABORATORY PRESS, US, Bd. 7, Nr. 6, 1. Juni 1997 (1997-06-01), Seiten 606-614, XP000699761 ISSN: 1088-9051	19-21
X	das ganze Dokument	
X	BROWNIE JANNINE ET AL: "The elimination of primer-dimer accumulation in PCR" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 25, Nr. 16, 1997, Seiten 3235-3241, XP002152588 ISSN: 0305-1048	1,3,5, 16,17
Y	in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	
Y	WO 00/55366 A (UNIV NORTH CAROLINA ;ONTKO ALLYN C (US); THORP H HOLDEN (US)) 21. September 2000 (2000-09-21)	23-29
	das ganze Dokument	

-/--

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 97/01646 A (UNIV NORTH CAROLINA ;JOHNSTON DEAN H (US); THORP H HOLDEN (US)) 16. Januar 1997 (1997-01-16) das ganze Dokument ----	23-29
Y	THORP H H: "Cutting out the middleman: DNA biosensors based on electrochemical oxidation" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, Bd. 16, Nr. 3, 1. März 1998 (1998-03-01), Seiten 117-121, XP004108589 ISSN: 0167-7799 das ganze Dokument ----	23-29
A	INNIS, M., GELFAND, D., SNINSKY, J.: "PCR applications, protocols for functional genomics, chapter 6, Multiplex PCR: optimization guidelines" Mai 1999 (1999-05), ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, USA XP002276448 Seite 73 -Seite 94 ----	1-38
A	WO 02/059353 A (BIO S & T ;LING PENG (CA); LIU JIN-HAO (CA); CAI QINYIN (CA)) 1. August 2002 (2002-08-01) das ganze Dokument -----	14



## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/ISA/210/3/12694

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9958721	A	18-11-1999	AU WO	3984699 A 9958721 A1	29-11-1999 18-11-1999
DE 10046184	A	04-04-2002	DE WO EP	10046184 A1 0224944 A2 1327004 A2	04-04-2002 28-03-2002 16-07-2003
WO 9641012	A	19-12-1996	US AT AU AU CA DE DE EP JP WO US	5882856 A 232242 T 703417 B2 6163696 A 2223729 A1 69626111 D1 69626111 T2 0832290 A1 11507226 T 9641012 A1 6207372 B1	16-03-1999 15-02-2003 25-03-1999 30-12-1996 19-12-1996 13-03-2003 24-12-2003 01-04-1998 29-06-1999 19-12-1996 27-03-2001
WO 0214534	A	21-02-2002	AU EP WO US	7762001 A 1327001 A2 0214534 A2 2003207302 A1	25-02-2002 16-07-2003 21-02-2002 06-11-2003
WO 03060159	A	24-07-2003	GB WO	2384308 A 03060159 A2	23-07-2003 24-07-2003
WO 0047766	A	17-08-2000	AU EP WO	2447100 A 1151136 A1 0047766 A1	29-08-2000 07-11-2001 17-08-2000
WO 0055366	A	21-09-2000	US AU CA CN EP JP NO NZ WO US US	6180346 B1 2983500 A 2366866 A1 1343260 T 1161560 A1 2002539462 T 20014429 A 513604 A 0055366 A1 6346387 B1 2002037530 A1	30-01-2001 04-10-2000 21-09-2000 03-04-2002 12-12-2001 19-11-2002 09-11-2001 28-03-2003 21-09-2000 12-02-2002 28-03-2002
WO 9701646	A	16-01-1997	US AT AU AU CA CN DE DE DK EP EP JP NO NZ US	5871918 A 223498 T 724600 B2 6337696 A 2225935 A1 1192249 A 69623494 D1 69623494 T2 871773 T3 1193315 A1 0871773 A2 2000501601 T 976057 A 311955 A 2002106683 A1	16-02-1999 15-09-2002 28-09-2000 30-01-1997 16-01-1997 02-09-1998 10-10-2002 17-04-2003 09-12-2002 03-04-2002 21-10-1998 15-02-2000 24-02-1998 29-04-1999 08-08-2002

# INTERNATIONALES RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/1993/12694

Im Recherchenbericht angeführtes Patentedokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9701646 A		WO 9701646 A2	16-01-1997
		US 6180346 B1	30-01-2001
		US 6127127 A	03-10-2000
		US 6387625 B1	14-05-2002
		US 6361951 B1	26-03-2002
		US 6346387 B1	12-02-2002
		US 5968745 A	19-10-1999
		US 2002037530 A1	28-03-2002
		US 6132971 A	27-10-1998
WO 02059353 A	01-08-2002	CA 2332610 A1	26-07-2002
		WO 02059353 A2	01-08-2002
		US 2002155448 A1	24-10-2002